

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ  
VETERINARĂ BUCUREȘTI**

**FACULTATEA DE HORTICULTURĂ**

**CONTRIBUȚII LA OBTINEREA UNOR SUPLIMENTE  
NUTRITIVE DIN DROJDII DE VIN, CU ADAOS DE  
CROM ȘI SELENIU**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC,  
Prof.univ.dr. GHEORGHE CÂMPEANU**

**DOCTORAND,  
ing. IULIANA DIANA BĂRBULESCU  
Cercet. șt. gr. III**

**BUCUREȘTI  
2007**

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b> .....	<b>1</b>
<b>STADIUL CUNOAȘTERII</b> .....	<b>4</b>
<b>CAPITOLUL I</b>	<b>4</b>
I.1. PARTICULARITĂȚI ALE DROJDIILOR .....	4
I.1.1. Caracteristici morfologice și genetice ale drojdiilor.....	4
I.1.2. Aplicațiile practice ale drojdiilor .....	6
I.2. CREȘTEREA DROJDIILOR.....	11
I.3. SOIURILE DE VIȚĂ DE VIE ȘI AREALELE VITICOLE DIN ROMÂNIA .....	13
I.3.1. Soiurile de viță roditoare cultivate în România .....	13
I.3.2. Arealele viticole delimitate din România.....	14
I.4. CROMUL.....	16
I.4.1. Distribuția cromului în sol.....	16
I.4.2. Paradoxul cromului - toxicul și necesarul.....	17
I.4.2.1. Toxicitatea cromului.....	17
I.4.2.2. Necesarul de crom .....	18
I.4.3. Deficiența cromului.....	19
I.4.4. Metabolismul, rolul și aplicațiile cromului.....	20
I.4.5. Semnificația biologică a formelor organice de crom.....	22
I.4.6. Prooxidanți.....	23
I.4.7. Izolarea și selecția tulpinilor de drojdie capabile să metabolizeze cromul.....	24
I.4.8. Metode de cultivare a drojdiilor privind obținerea unor suplimente nutritive pe bază de biomasă cromiată.....	25
I.4.9. Influența parametrilor de cultivare asupra dezvoltării biomasei de drojdie cromiată.....	27
I.4.10. Prelucrarea mediului fermentat pentru obținerea unor produși pe bază de biomasă de drojdie cromiată.....	28
I.4.11. Efectul cromului asupra sintezei proteice.....	28
I.4.12. Analiza privind determinarea cantitativă și calitativă a cromului.....	29
I.4.13. Testarea farmacologică.....	30
I.5. SELENIUL.....	32
I.5.1. Distribuția seleniului în sol.....	32
I.5.2. Paradoxul seleniului – toxicul și necesarul.....	33
I.5.2.1. Toxicitatea seleniului.....	33
I.5.2.2. Necesarul de seleniu.....	35
I.5.3. Deficiența.....	37
I.5.4. Metabolismul, rolul și aplicațiile seleniului.....	38
I.5.5. Antioxidant/prooxidant.....	44
I.5.5.1. ANTIOXIDANȚI.....	45
I.5.5.1.1. Radicalii liberi.....	45
I.5.5.2. Pro-oxidanți.....	51
I.5.6. Semnificația biologică a formelor organice de seleniu.....	51
I.5.7. Seleniul - aliment – medicament.....	52
I.5.8. Izolarea și selecția tulpinilor de drojdie capabile să metabolizeze seleniul.....	53

1.5.9. Metode de cultivare a drojiilor privind obținerea unor suplimente nutritive pe bază biomasă de drojdie seleniată.....	54
1.5.10. Metode de determinare a seleniului din mediul fermentat și biomasa de drojdie seleniată.....	54
<b>1.6. PRODUSE ACTUALE PE BAZĂ DE BIOMASĂ DE DROJDIE CROMIATĂ SI/SAU SELENIATĂ .....</b>	<b>57</b>
1.6.1. Produse actuale pe bază de biomasă de drojdie cromiată.....	57
1.6.2. Produse actuale pe bază de biomasă de drojdie seleniată.....	57
1.6.3 Izolarea și selecția tulpinilor de drojdii capabile să metabolizeze seleniul și cromul.....	58
<b>1.7.SUPLIMENTE NUTRITIVE.....</b>	<b>58</b>
1.7.1.Suplimentarea cu crom în conextul actual.....	58
1.7.2 Suplimentarea cu seleniu în conextul actual.....	61
<b>SCOPUL PRIVIND DEZVOLTAREA CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU</b>	<b>65</b>
<b>CAPITOLUL II –MATERIALE SI METODE .....</b>	<b>67</b>
II.1.1 Microorganisme, medii de cultură și condiții de cultivare.....	67
II.1.2. Izolarea tulpinilor de drojdie, screeningul (selecția) lor.....	68
II.1.3. Selecția tulpinilor de drojdie pentru obținerea biomasei îmbogățită cu crom organic sau seleniu organic.....	69
<b>II. 2. MEDII DE CULTURĂ ȘI CONDIȚII DE CULTIVARE ÎN VEDEREA OBȚINERII SUPLIMENTELOR NUTRITIVE.....</b>	<b>72</b>
II.2.2. Optimizarea mediului de cultură și elaborarea modelului cinetic.....	72
II.1.1 Microorganisme, medii de cultură și condiții de cultivare.....	73
II.3.1.Medii de cultură și condiții de cultivare.....	80
II.3.2. Optimizarea bioprocesului.....	80
II.4 DETERMINAREA PRODUCTIVITATII SPECIFICE.....	82
II.5. DESCRIEREA APARATURII .....	82
II.6 CONSERVAREA TULPINII PRODUCTIVE.....	83
II.7. FORMULAREA ȘI CONDIȚIONAREA.....	84
II.8 OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA INOCULULUI PENTRU FAZA PILOT	87
II.10. STABILIREA PARAMETRIILOR FLUXULUI POST-FERMENTAȚIE PENTRU OBȚINEREA SUBSTANȚEI ACTIVE.....	88
II.10. STABILIREA PARAMETRIILOR FLUXULUI POST-FERMENTAȚIE PENTRU OBȚINEREA SUBSTANȚEI ACTIVE.....	90
II.12. DETERMINAREA SELENIULUI TOTAL DIN BIOMASA DE DROJDIE....	91
II.13. DETERMINAREA SELENIULUI ANORGANIC DIN BIOMASA DE DROJDIE SELENIATĂ.....	93
II. 14. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A BIOMASEI DE DROJDIE CROMIATE SI SELENIATE .....	94
II.15. TESTĂRI FARMACOLOGICE.....	98
<b>CAPITOLUL III – REZULTATE SI DISCUTII.....</b>	<b>104</b>
<b>III.1. OBȚINEREA DE AGENȚI BIOLOGIC ACTIVI ÎN VEDEREA OBȚINERII DE DROJDIE CROMIATĂ .....</b>	<b>104</b>
III.1.1. Microorganisme, medii de cultură și condiții de cultivare .....	104
III.1.2. Model de viabilitate privind adaptarea tulpinilor de drojdii la diferite concentrații de clorură cromică sau selenit de sodiu .....	106
III.1.3. Selecția și caracterizarea unor noi tulpini de drojdii.....	108
III.1.4. Selecția și caracterizarea unor tulpini de drojdii rezistente la concentrații crescute de seleniu.....	117

III.1.5. Resistența tulpinilor de drojdii la crom și seleniu.....	118
III.2. STABILIREA CONDIȚIILOR DE CULTIVARE PENTRU PRODUCEREA BIOMASEI DE DROJDIE ÎMBOGĂȚITĂ CU CROM ORGANIC.....	121
III.3. STABILIREA CONDIȚIILOR DE CULTIVARE PRIVIND OBȚINEREA BIOMASEI DE DROJDIE "SELENIATĂ".....	157
III.4. ÎNTREȚINEREA TULPINII PRODUCTIVE.....	190
III.5 FORMULAREA ȘI CONDIȚIONAREA BIOPRODUSELOR BAZATE PE BIOMASĂ DE DROJDIE SELENIATĂ.....	194
III.6. RIDICAREA PROCESULUI PRIVIND OBȚINEREA DE DROJDIE SELENIATĂ LA NIVEL PILOT .....	200
III.7. TESTAREA FARMACOLOGICĂ A BIOMASELOR DE DROJDIE CROMIATA ȘI SELENIATĂ.....	218
<b>IV CONCLUZII.....</b>	<b>222</b>
<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>226</b>
<b>CONTRIBUȚII PROPRII.....</b>	<b>238</b>
<b>ANEXA</b>	

## **INTRODUCERE**

În cercetarea biotehnologică există un interes crescut privind elaborarea tehnologiilor de obținere a unor preparate de tip “supliment” ce conțin biomasă de drojdie îmbogățită cu elemente minerale: seleniu, zinc, crom, magneziu, fosfor etc, preparate utilizate în tratamentul profilactic la om și animale (J.Goulet, 2002).

Termenul de drojdie îmbogățită în minerale („Mineral Enriched Yeast”- MEY) se referă la diferite produse bazate pe drojdia *Saccharomyces cerevisiae* (H.S. Basaga, 1990).

În prezent există o serie de tehnologii de obținere, a unor preparate pe bază de biomasă seleniată, realizate prin biotransformare cu ajutorul unor tulpini de drojdii (A. Ioniță, 2004).

La nivel mondial există o serie de zone în care mineralele de tipul seleniu, zinc, crom, magneziu, fosfor care se găsesc în cantități dezechilibrate. Acestea au determinat intensificarea studiilor legate de ajustarea și crearea unui optim de concentrație la nivelul alimentației.

Deficiența de seleniu (de exemplu în China aportul mediu de seleniu este de 10-15 ppm/zi) se asociază cu maladia Keshan, o formă endemică virală de cardiomiopatie care afectează copiii și femeile tinere, în timp ce excesul a provocat apariția intoxicațiilor de tipul “Alkali disease”. De asemenea, tratamentul cu seleniu organic este indicat în stări de deficit fiziologic (eforturi fizice mari la sportivi, coalescenți, astenici), intoxicații cronice (tabagism, alcoolism), otrăviri cu metale grele, pesticide și diverși poluanți), emfizem pulmonar, depresii imunologice. De aici și paradoxul: cromul și seleniul sunt minerale esențiale dar, în același timp, în cantități inadecvate pot deveni toxice (Mertz, 1969 și Lehman, 1932).

Pentru prevenirea problemelor de sănătate au fost luate măsuri, care se referă la ajustarea balanței alimentare, la reglarea unei diete care să nu provoace perturbări grave și maladii, deci care să creeze un echilibru mineral.

Mineralele de tipul seleniului și cromului există și în plante, dar cantitățile respective sunt inegale și insuficiente pentru a realiza un echilibru normal la nivelul organismului uman sau animal. Din acest motiv cercetările din ultima vreme s-au axat pe realizarea unor produse pe bază de drojdie (drojdie cromiată și drojdie seleniată), utilizabile fie ca aditivi furajeri fie ca suplimente nutritive pentru om.

**CONTRIBUȚII LA OBTINEREA UNOR SUPLIMENTE NUTRITIVE DIN DROJDII DE VIN, CU ADAOS DE CROM ȘI SELENIU**

---

Este evident faptul că pentru administrarea elementelor minerale menționate, este necesară o formă de administrare adecvată, astfel încât să se realizeze un optim de concentrație.

Cercetările efectuate până în prezent au arătat că mineralele anorganice nu reprezintă modalitatea cea mai potrivită de administrare, pe de o parte datorită efectului lor poluant și, pe de altă parte, eficienței lor scăzute comparativ cu formele organice, ale acestor elemente (seleniu și cromul organic).

Diferențele majore dintre formele organice și cele anorganice în ceea ce privește activitatea metabolică precum și modul de interacțiune cu alte elemente și enzime determină o serie de cercetări în vederea prevenirii bolilor asociate precum cancerul.

Conținutul de crom din alimente, ca și necesarul de crom al organismului sunt dificil de măsurat, de aceea în literatura de specialitate se utilizează valori estimate ale aportului dietetic adecvat.

În cazul cromului, toate formele organice și anorganice ale acestui element utilizate în alimentație sunt  $\text{Cr}^{3+}$ . Rolul principal al cromului este de a potența interacțiunea dintre insulină, (hormon secretat de celulele specializate din pancreas, ca răspuns la nivelul crescut al glucozei din sânge) și receptorii celulari într-un complex numit GTF (Glucose Tolerance FACTOR). Aceasta este format din crom trivalent complexat cu acid nicotinic și aminoacizi (glicină, acid glutamic și cisteină). Cromul este considerat a fi cofactor pentru toate activitățile insulinice, în primul rând pentru reglarea metabolismului glucidic, protidic și lipidic (Varga, 2004).

Dintre formele organice de crom și de seleniu, drojdia cromiată și drojdia seleniată realizează performanțe mai mari atunci când sunt utilizate în hrana animalelor, deoarece aceste forme sunt produse într-un mod apropiat celui natural.

Drojdia de bere conține crom în mod natural (2 ppm organic). Acest conținut de crom celular poate fi îmbunătățit prin introducerea unei surse de crom anorganic ( $\text{CrCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ) în mediul de cultură.

În timpul creșterii și multiplicării celulelor, cromul sau seleniul sunt introduse în celulele de drojdie.

S-a demonstrat că seleniul din drojdie este forma cea mai bine asimilată de către organism, deoarece acesta este produs în culturi submerse unde sărurile anorganice de seleniu (selenitul sau seleniatul de sodiu) sunt transformate într-o formă organică prin incorporare în celula de drojdie (Margaret, 2004). De asemenea peste jumătate din cromul din drojdia de bere se află în formă organică.

**CONTRIBUȚII LA OBTINEREA UNOR SUPLEMENTE NUTRITIVE DIN DROJDII DE VIN, CU ADAOS DE CROM ȘI SELENIU**

Există firme de profil din străinătate cum ar fi Lallemand, Lavile, Pharma-Nord, Alltech, Diamond sau Nutritek care produc și comercializează preparate pe bază de biomasă de drojdie.

În România se comercializează preparate din import cum ar fi: Sel-plex produs de Alltech, Bio-Chrom-FTG, și Bio-Siluet produse de Pharma-Nord-Danemarca precum și medicamente ce conțin crom organic care sunt doar condiționate în țară (compușii organici ce conțin crom sunt procurați din import Crom - Diet).

Data fiind utilitatea compușilor organici de crom și seleniu este important de selectat și caracterizat tulpini de drojdii de vin capabile să crească pe medii de cultură ce conțin săruri minerale anorganice de crom și seleniu ( $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  și  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ).

Drojdiile de vin reprezintă sedimentul rezultat prin depunerea biomasei de drojdie ce a participat la fermentația mustului și obținerea vinului.

Pentru a putea ajunge la o dietă optimă a fost necesară elaborarea unor metode de obținere a unor suplimente nutritive pe bază de drojdie cromiată și drojdie seleniată, cu ajutorul biotehnologiilor moderne. Aceste metode vor elimina metodele "tradiționale" de sinteză chimică (de exemplu: crom picolinat), care prin numeroase studii s-au dovedit a avea efect cancerigen.

Experimentările realizate pe parcursul tezei de doctorat au avut un prim scop izolarea și selecția unor tulpini de drojdii de vin, care au proprietatea de a crește și de a se dezvolta submers în condiții optime de cultivare, în vederea obținerii de biomasă îmbogățită în crom și seleniu.

Abordarea unui model nou de selecție (adaptarea tulpinilor de drojdie în trepte la concentrații crescute de clorură cromică sau selenit de sodiu), optimizarea mediului de cultură, optimizarea parametrilor de cultivare, prelucrarea mediului fermentat, realizarea de șarje reproductibile simultan cu testările analitice și în final testările farmacologice, au contribuit la obținerea de suplimente nutritive.